

5
PCT/JP 99/01803

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

06.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 6月18日

RECD 31 MAY 1999

WIPO PCT

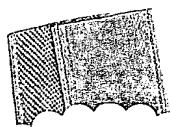
出願番号
Application Number:

平成10年特許願第170407号

出願人
Applicant(s):

塩野義製薬株式会社

BEST AVAILABLE COPY

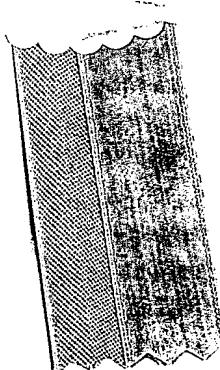
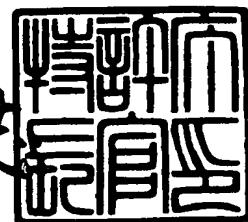


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3028570

【書類名】 特許願
【整理番号】 A005894
【提出日】 平成10年 6月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 5/00
【発明の名称】 破骨細胞前駆細胞の単離並びにその破骨細胞への分化誘導法
【請求項の数】 14
【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区住吉本町1-1-39-402
【氏名】 前田 朋子
【発明者】
【住所又は居所】 奈良県生駒郡平群町緑ヶ丘3-1-21
【氏名】 鈴木 隆二
【発明者】
【住所又は居所】 兵庫県神戸市須磨区須磨寺町1-3-7
【氏名】 越智 隆弘
【特許出願人】
【識別番号】 000001926
【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社
【代表者】 塩野 芳彦
【代理人】
【識別番号】 100108970
【弁理士】
【氏名又は名称】 山内 秀晃
【電話番号】 06-455-2056
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 平成10年特許願第 95962号
【出願日】 平成10年 4月 8日

【整理番号】 A005854

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044602

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9720909

【ブルーフの要否】 要

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 明細書

【発明の名称】 破骨細胞前駆細胞の単離並びにその破骨細胞への分化誘導法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法。

【請求項2】 培養条件としてIL-3、IL-7、GM-CSF又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地を使用する請求項1に記載の方法。

【請求項3】 末梢血単核球マイトジエン刺激培養上清を含む培地を使用する請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 末梢血単核球マイトジエン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である請求項3記載の方法。

【請求項5】 末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1~3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法。

【請求項6】 末梢血または関節液をサイトカイン非存在の哺乳類細胞基本培地に添加し、35~37°C、5~7%CO₂下で1~3週間培養することにより、破骨細胞前駆細胞を除く細胞を死滅させ、破骨細胞前駆細胞のみを単離する請求項5記載の方法。

【請求項7】 請求項5または6のいずれかに記載の方法により単離されることを特徴とする破骨細胞前駆細胞。

【請求項8】 請求項5または6のいずれかに記載の方法により得られた破骨細胞前駆細胞を、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞に分化させる方法。

【請求項9】 培養条件としてIL-3、IL-7、GM-CSF又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地を使用する請求項8に記載の方法。

【請求項10】 末梢血単核球マイトジエン刺激培養上清を含有する培地を使用する請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】 末梢血単核球マイトジエン刺激培養上清がヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清である請求項10記載の方法。

【請求項12】 請求項1～4、8～11のいずれかに記載の方法により得られたことを特徴とする破骨細胞。

【請求項13】 請求項12に記載の破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法。

【請求項14】 請求項13記載のスクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

BEST AVAILABLE COPY

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、支持細胞非存在下で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、該破骨細胞を用いたスクリーニング方法およびそのスクリーニング方法により得られた骨代謝疾患治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

哺乳類の骨組織は、骨吸収と骨形成を繰り返している。そして、成長期はもちろん、個体が成熟した後もカルシウム代謝の中心として機能しながら骨吸収と骨形成のバランスが保たれている。

【0003】

これは破骨細胞と骨芽細胞との間で密接な情報伝達が行われて、骨吸収と骨形成の平衡が保たれているためである。

しかし、骨吸収と骨形成のバランスが崩れると骨代謝疾患が生じる。骨代謝疾患としては、骨粗鬆症、慢性関節リウマチ、変形性関節症、糖尿病とともに骨量の減少、種々のホルモン異常、栄養障害、大理石病、骨軟化症などが挙げられるが、病態の細胞学的解明はあまり進んでいないのが現状である。

【0004】

従って、これら骨代謝疾患を解明し、治療薬を開発するためには、破骨細胞や骨芽細胞の単離と性状解析が必要とされてきた。

【0005】

従来、破骨細胞の単離に関する研究は、主にマウスやラットにおいて進められてきたが、近年はヒト破骨細胞の単離について研究が進められており、Fujikawa, Y., Sabokbar, A., Neale, S., and Athanasou, N.A., "Human osteoclast formation and bone resorption by monocytes and synovial macrophages in rheumatoid arthritis" *Annals of Rheumatic Diseases*, 55; 816-822, 1996.において、慢性関節リウマチ患者の滑膜組織からマウス骨芽細胞様細胞株の存在下で破骨細胞を得ることが報告されている。該報告においては、マウス骨芽細胞様細胞株の存在下で破骨細胞を得ているが、これは破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化は、骨髓ストローマ細胞や骨芽細胞などとの協調により起こるため、*in vitro*における破骨細胞前駆細胞の分化誘導には骨髓ストローマ細胞や骨芽細胞などの支持細胞の存在が不可欠であると考えられていたためである。

【0006】

一方、特開平7-194373では、骨髓ストローマ細胞又は骨芽細胞を含まない培地にて、骨髓細胞を、骨芽細胞、破骨細胞又は軟骨細胞に分化させる方法について記述しているが、破骨細胞自体の単離には成功していない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化機構を解析のためには、破骨細胞の前駆細胞から破骨細胞への分化に関与する因子が少ない、特に支持細胞を必要としない破骨細胞の分化誘導方法の確立が望まれていた。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、破骨細胞の分化誘導に関与する因子を少なくする方法を提供することを目的として銳意研究を重ねた結果、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、該方法により単離された破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法及び該破骨細胞、該破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法及び該スクリーニング方法によって得られる骨代謝疾患治療剤に関する

発明を完成させた。

BEST AVAILABLE COPY

【0009】

本発明によれば、同一個体から繰り返し破骨細胞が入手でき、病態生理学的な検討や免疫学的な検討を加えることができる。また、本発明の破骨細胞を用いることにより、化合物が骨代謝疾患の治療に有用であるか否かのスクリーニングを容易に行うことが可能である。例えば、破骨細胞の骨吸収活性を阻害する化合物をスクリーニングより得た場合、この化合物は、過剰な骨吸収により生じる骨粗鬆症、糖尿病とともに骨量の減少、骨軟化症などの治療に有用である。

【0010】

本発明の1つは、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法に関する。この場合、「支持細胞」とは、破骨細胞前駆細胞に対し、接着および液性因子の産出を通じて、その分化誘導を行なうことができる間葉系細胞を意味する。「支持細胞」としては、骨髄ストローマ細胞、骨芽（細胞様）細胞、線維芽細胞、腫瘍細胞などが例示される。「破骨細胞前駆細胞」とは、夾雑細胞を実質的に含まない破骨細胞前駆細胞を意味し、具体的にはヒト破骨細胞前駆細胞である。「破骨細胞」とは、夾雑細胞を実質的に含まない破骨細胞を意味し、具体的にはヒト破骨細胞である。該方法は、具体的には、IL-3、IL-7、GM-CSF又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地で、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる方法に関する。IL-3、IL-7またはGM-CSFは、天然型あるいは組換え型のいずれであってもよい。IL-3、IL-7、GM-CSF又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地として、単核球マイトジエン刺激培養上清を含有する培地を用いてもよい。末梢血单核球マイトジエン刺激培養上清としては、ヒト末梢血单核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清を用いる場合もある。

【0011】

また、本発明は、末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1～3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法に関する。具体的には末梢血または関節液を、サイトカイン「非存在下で」あるいは「不含の」哺乳類細胞基本培地に添加し、35～37℃、5～7%CO₂下で1～3週間培養するこ

とにより、破骨細胞前駆細胞を除く細胞を死滅させ、破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法、または該方法により得られることを特徴とする破骨細胞前駆細胞に関するものである。

「末梢血」とは、哺乳動物の末梢血であり、具体的にはヒト末梢血である。ヒト末梢血を使用する場合には、健常人の末梢血を用いることが出来る。

「関節液」としては、健常人の関節液を用いることもできるが、具体的には慢性関節リウマチ（R A）患者の関節より得られた関節液を意味する。

「哺乳類細胞基本培地」とは、細胞が生存するために利用可能な無機塩類と必須アミノ酸またはその誘導体、ビタミン類またはその誘導体を含んだ等張の緩衝液を意味する。「哺乳類細胞基本培地」としては、Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)、RPMI 1 6 4 0 またはAIM-Vなどが例示できる。

「破骨細胞前駆細胞」とは、夾雜細胞を実質的に含まない破骨細胞前駆細胞を意味する。

【0012】

更に本発明は、前述の末梢血または関節液をサイトカイン非存在下で1～3週間培養することにより破骨細胞前駆細胞のみを単離する方法により得られた破骨細胞前駆細胞を、支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞に分化させる方法に関する。具体的には、IL-3、IL-7、GM-CSF又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物を含有する培地で、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる方法に関する。IL-3、IL-7、GM-CSFは、天然型あるいは組換え型のいずれであってもよい。IL-3、IL-7、GM-CSF又はこれら2以上の組み合わせからなる混合物の含有する培地として、末梢血単核球マイトジエン刺激培養上清を含有する培地を用いてもよい。末梢血単核球マイトジエン刺激培養上清として、ヒト末梢血単核球フィトヘマグルチニン刺激培養上清を用いる場合もある。

「破骨細胞」とは、夾雜細胞を実質的に含まない破骨細胞を意味する。

【0013】

別の態様として、本発明は、本発明の破骨細胞を用いることを特徴とする骨代謝疾患治療剤のスクリーニング方法及び該スクリーニング方法によって得られる

BEST AVAILABLE COPY

骨代謝疾患治療剤に関するものである。

「骨代謝疾患」としては、骨粗鬆症、慢性関節リウマチ、糖尿病にともなう骨量の減少、骨軟化症などが例示される。

「スクリーニング方法」として、例えば、本発明の破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法を用い、該方法において化合物を添加することにより分化が阻害された場合、あるいは、本発明の破骨細胞を培養液中で培養し、この培養液に化合物を添加することで、該破骨細胞の骨吸収活性が阻害された場合、該化合物は過剰な骨吸収により生じる骨粗鬆症、糖尿病にともなう骨量の減少、骨軟化症などの治療に有用な化合物であることが示唆される。このように、本発明の破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法を用い、化合物の添加による分化誘導の促進あるいは抑制を測定したり、本発明の破骨細胞を含む培養液中に化合物を添加し、破骨細胞の骨吸収能の活性あるいは阻害を測定することで、容易に骨代謝疾患治療剤として有望な化合物のスクリーニングを行なうことができる。

【0014】

【実施例】

本発明で目的とするヒト破骨細胞は以下に示す方法によって得ることが出来る。

実施例1 慢性関節リウマチ患者の関節液由来のヒト破骨細胞の単離

(1) 細胞成分の分離

慢性関節リウマチ患者の関節より関節液を得る。関節液は、4℃で試験管中に保存する。なお、以下の操作は原則として無菌条件下で行う。1ml～数十ml採取する。この関節液に等量のRPMI 1640培地(GIBCO BRL, #22400又はその等価物)を添加した後、1000rpm、4℃、5分間遠心分離し、顆粒球やリンパ球などを含む細胞成分を得る。

【0015】

(2) 破骨細胞前駆細胞の単離

得られた細胞成分を、10% (v/v) ウシ胎仔血清(Fetal Calf Serum:FCS)を添加したDMEM(GIBCO BRL, #12430-21又はその等価物)にて、37℃、5～7%CO₂下で数週間培養した。これにより破骨細胞前駆細胞を除く細胞は死

滅し、破骨細胞前駆細胞（図1、図2）のみが残った。

【0016】

（3）培地の調製

破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる培地を調製する。AIM-V培地（GIBCO BRL, #87-0112）400mlに、RPMI1640培地（GIBCO BRL, #22400）60ml、ヒトT-STIM40ml（10BRMP/ml；BRMP, Biological Response Modifier Program Jurkat IL-2 reference reagent）、FCS 10%（V/V）（予め56℃で30分間熱処理し非効化したもの）50mlおよび抗生物質（ペニシリン100U及び100μg/mlストレプトマイシン；GIBCO BRL, #15140-015又はその等価物）を補充して、培地（以下、培地Aと称する）とした。ヒトT-STIMとは、フィトヘマグルチニンで刺激した、ヒト末梢血単核球の培養上清である（Human T-STIM with PHA, Becton Dickinson, #40045）。

【0017】

（4）破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

実施例1（2）で得られた破骨細胞前駆細胞を実施例1（3）に記載の培地Aで刺激すると、37℃・48-96時間で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が起こり、破骨細胞が得られた（図1、図2）。

【0018】

（5）分化誘導能を有するサイトカインの特定

ヒトT-STIMは様々なサイトカインを含有している。このヒトT-STIMに含まれるサイトカインの内、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導能を有するサイトカインを特定するため、実施例1（3）に記載の培地Aの成分を変えて、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞の分化を誘導を試みた。

【0019】

①培地の調製

培地として、実施例1（3）に記載の培地Aに含まれるヒトT-STIMを以下のサイトカインまたはサイトカインの混合物に代えて、以下に示す13種類の培地（B～N）を調製した。なお、ヒトT-STIM以外の、AIM-V培地（GIBCO BRL, #87-0112

BEST AVAILABLE COPY

)、RPMI 1640培地(GIBCO BRL, #22400)、FCS 10% (V/V) 及び抗生物質(ペニシリ
ン100U及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン; GIBCO BRL, #15140-015又はその等価
物)は培地Aと同一のものを使用した。

- ・培地B: リコンビナントヒトIL-1 (R & D Systems, #201-LBあるいは#200-LAま
たはその等価物) $0.5\sim5\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml
+抗生物質

- ・培地C: リコンビナントヒトIL-2 (R & D Systems, #202-ILあるいはその等価物
) $50\sim200\text{U}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物質

- ・培地D: リコンビナントヒトIL-3 (R & D Systems, #403-ML-010あるいはその
等価物) $2\sim10\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物
質

- ・培地E: リコンビナントヒトIL-4 (Genzyme, #2181-01あるいはその等価物) 50
 $\sim200\text{U}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物質

- ・培地F: リコンビナントヒトIL-6 (R & D Systems, #206-ILあるいはその等価物
) $10\sim20\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物質

- ・培地G: リコンビナントヒトIL-6 (R & D Systems, #206-ILあるいはその等価物
) $10\sim20\text{ng}/\text{ml}$ +リコンビナントヒト可溶化IL-6レセプター (R & D Systems, #22
7-SRあるいはその等価物) $100\sim300\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml
+FCS 50ml+抗生物質

- ・培地H: リコンビナントヒトIL-7 (Genzyme, #1587-00あるいはその等価物) 5
 $\sim20\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物質

- ・培地I: リコンビナントヒトIL-11 (R & D Systems, #218-ILあるいはその等価
物) $1\sim4\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物質

培地J: リコンビナントヒトM-CSF (R & D Systems, #216-MC-010あるいはその等
価物) $2.5\sim100\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物
質

- ・培地K: リコンビナントヒトGM-CSF (R & D Systems, #215-GM-010あるいはそ
の等価物) $1\sim5\text{ng}/\text{ml}$ +AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生物
質

・培地L：リコンビナントヒトIL-3（R & D Systems, #403-ML-010あるいはその等価物）2～10ng/ml+リコンビナントヒトIL-7（Genzyme, #1587-00あるいはその等価物）5～20ng/ml+AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生素質

・培地M：リコンビナントヒトIL-7（Genzyme, #1587-00あるいはその等価物）5～20ng/ml+リコンビナントヒトGM-CSF（R & D Systems, #215-GM-010あるいはその等価物）1～5ng/ml+AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生素質

・培地N：リコンビナントヒトIL-3（R & D Systems, #403-ML-010あるいはその等価物）2～10ng/ml+リコンビナントヒトIL-7（Genzyme, #1587-00あるいはその等価物）5～20ng/ml+リコンビナントヒトGM-CSF（R & D Systems, #215-GM-010あるいはその等価物）1～5ng/ml+AIM-V培地400ml+RPMI 1640培地60ml+FCS 50ml+抗生素質

【0020】

②破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

実施例1（2）で得られた破骨細胞前駆細胞を、前述の培地B～Nを用いて、37℃・48～96時間培養した。このうち、培地D、H、K、L、M及びNでは破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が確認された。一方、培地B、C、E、F、G、I及びJでは、破骨細胞前駆細胞の分化が起こらなかった。この結果、IL-3、IL-7、GM-CSF及びこれらの混合物は、破骨細胞前駆細胞に対する分化誘導能を有することが明らかとなった。一方、IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-11及びGM-CSFが破骨細胞前駆細胞に対する分化誘導能を有しないことも確認された。

【0021】

従来、支持細胞を必要とする破骨細胞前駆細胞の分化においては、IL-1、IL-6、IL-11又はGM-CSFはそれぞれ単独で分化を促進するサイトカインであることが知られていた。しかし、これらサイトカインが破骨細胞前駆細胞そのものを刺激して分化が促進されたものであるか、サイトカインが支持細胞を刺激していた結果、破骨細胞前駆細胞の分化が誘導されたのかは明らかではなかった。

一方、本発明の支持細胞を必要としない破骨細胞前駆細胞の分化においては、

IL-3、IL-7及びGM-CSFが分化誘導能を有することが明らかとなった。同時に、破骨細胞前駆細胞そのものの分化に対して、IL-1、IL-6、IL-11又はM-CSFは少なくとも単独かつ直接には作用しないことが確認された。

【0022】

BEST AVAILABLE COPY

実施例2 健常人の末梢血液由来のヒト破骨細胞の単離

健常人末梢血由来のヒト破骨細胞の単離

(1) 細胞画分の分離

健常人の末梢血50ml～200mlをヘパリンあるいはそれに代わる抗凝固剤の存在下で採取する。Ficoll-paque (Pharmacia Biotech) 比重遠心法により末梢血単核球分画 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を得る。PBMCはFCS 10% (V/V) 含有 RPMI 1640培地に 10^7 個/mlで浮遊後、60mm culture dishに1～1.5ml/dish、37°C、5～7%CO₂下で1-2時間培養する。培養後、37°CのFCS 10% (V/V) 含有 RPMI 1640培地でdishをリシスし、浮遊系細胞を取り除く。dishに付着した細胞は4°Cの血清不含RPMI 1640培地で強く洗い流し、末梢血単球分画 (全PBMCの約3-8%) として回収する。

【0023】

(2) 破骨細胞前駆細胞の単離

得られた単球分画 ($0.5-1 \times 10^6$ /ml) を、実施例1(2)と同様に、FCS 10% (v/v) を添加したDMEM (GIBCO BRL, #12430-21又はその等価物) にて、37°C、5～7%CO₂下で数週間培養した。これにより破骨細胞前駆細胞を除く細胞は死滅し、破骨細胞前駆細胞のみが残った。

【0024】

(3) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導

この破骨細胞前駆細胞を実施例1(3)に記載の培地Aで刺激すると、37°C・48-96時間で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が起こり、破骨細胞が得られた。これにより、慢性関節リウマチ患者関節液からだけでなく、健常人末梢血からも、破骨細胞が単離されることが確認された。

【0025】

実施例1(4)及び実施例2(3)で得られた細胞が、破骨細胞であることの

確認は以下の試験例（1）から（3）に従い行った。

【0026】

試験例

(1) 形態学的観察

May-Giemsa染色(MERCK)により細胞を染色し、顕微鏡を用いて観察した。染色後の破骨細胞前駆細胞および破骨細胞の顕微鏡写真に代わる図面を図1に示す。この結果、分化前の破骨細胞前駆細胞は単球様の形態を有するのに対して、得られた破骨細胞は全て多核(3~100以上)の巨細胞であることが認められた。

【0027】

(2) TRAP染色

分化前の破骨細胞前駆細胞および分化後の破骨細胞を、酒石酸耐性酸フォスファターゼ(Tartrate-resistant acid phosphatase:TRAP)染色キット(SIGMA Co.)により染色し、顕微鏡を用いて観察した。染色後の分化前の細胞(破骨細胞前駆細胞)および分化後細胞(破骨細胞)の顕微鏡写真に代わる図面を図2に示す。この結果、分化前の細胞(破骨細胞前駆細胞)でもTRAP陽性であるが、分化後の細胞(破骨細胞)は核周囲に殊に強いTRAP陽性像があることが認められた。

【0028】

(3) 骨吸収能

象牙スライスに分化前の破骨細胞前駆細胞を分化のおこる条件(実施例1(4))で培養後、ヘマトキシリン(SIGMA Co.)で象牙スライスを染色し位相差顕微鏡を用いて観察した。それぞれの表面の顕微鏡写真に代わる図面を図3に示す。分化前の破骨細胞前駆細胞は象牙スライスに変化を及ぼさないもの、分化後の破骨細胞はリン酸カルシウムを吸収し、吸収された部分の象牙スライスは濃く染色された。また、分化後の破骨細胞により吸収された象牙スライスを走査電子顕微鏡を用いて観察した。走査電子顕微鏡写真に代わる図面を図4に示す。中央部に吸収窓の形成が認められる。これは象牙質中のリン酸カルシウムが吸収されたことにより、コラーゲン繊維が露出したことにより形成されたもので

BEST AVAILABLE COPY

ある。

さらに、リン酸カルシウム焼結石英ディスク (OsteologicTM、住商ファーマ) の上で、破骨細胞前駆細胞を実施例1(4)にしたがって分化させ、リン酸カルシウム焼結石英ディスクを位相差顕微鏡を用いて観察した。それぞれの表面の顕微鏡写真に代わる図面を図5に示す。分化前の破骨細胞前駆細胞はリン酸カルシウム焼結石英ディスクに変化を及ぼさないものの、分化後の破骨細胞はリン酸カルシウムの吸収（結晶に空隙のできている部分）が認められた。

【0029】

以上、試験例に示された結果より、分化前の細胞が破骨細胞前駆細胞であることおよび分化後の細胞が破骨細胞であることが確認された。

【0030】

【発明の効果】

以上から明らかなように、本発明は、従来では困難であった破骨細胞前駆細胞の単離方法およびその破骨細胞前駆細胞を破骨細胞へ分化させる方法を提供するものである。得られた破骨細胞は、骨代謝異常の病態解明の手段、骨代謝異常を抑制する医薬品のスクリーニング方法および骨代謝異常疾患治療剤を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 May-Giemsa染色後の破骨細胞前駆細胞および破骨細胞を示す顕微鏡写真に代わる図面である。

【図2】 破骨細胞前駆細胞内および破骨細胞内のTRAPが染色されたことを示す顕微鏡写真に代わる図面である。

【図3】 象牙スライスを用いた破骨細胞前駆細胞および破骨細胞のリン酸カルシウム吸収能を示す顕微鏡写真に代わる図面である。

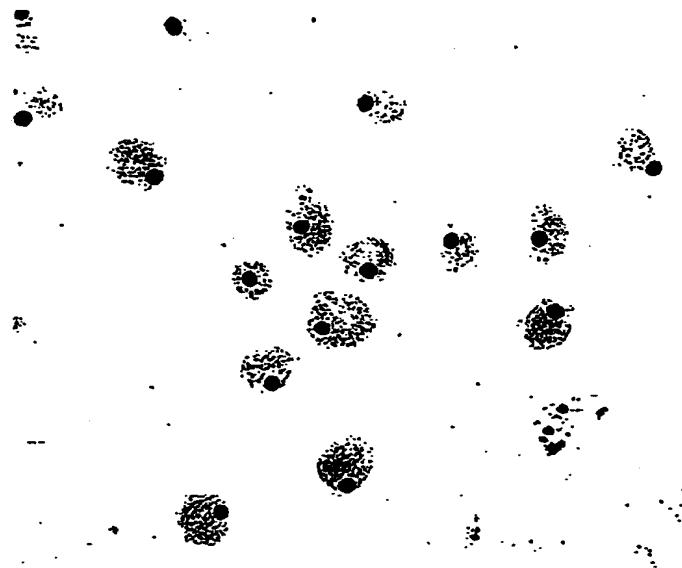
【図4】 破骨細胞が象牙スライスのリン酸カルシウムを吸収することで、形成された吸収窩を示す顕微鏡写真に代わる図面である。

【図5】 リン酸カルシウム焼結石英ディスクを用いた破骨細胞前駆細胞および破骨細胞のリン酸カルシウム吸収能を示す顕微鏡写真に代わる図面である。

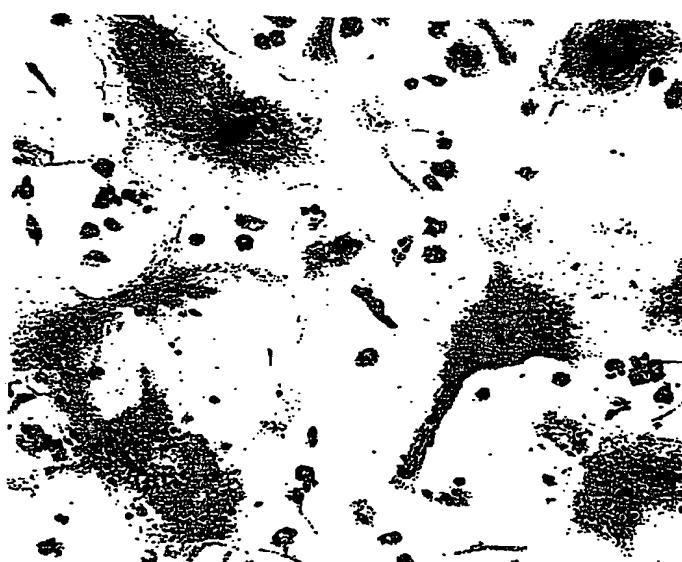
【書類名】 図面

【図1】

May-Giemsa 染色



破骨細胞前駆細胞 ($\times 40$)

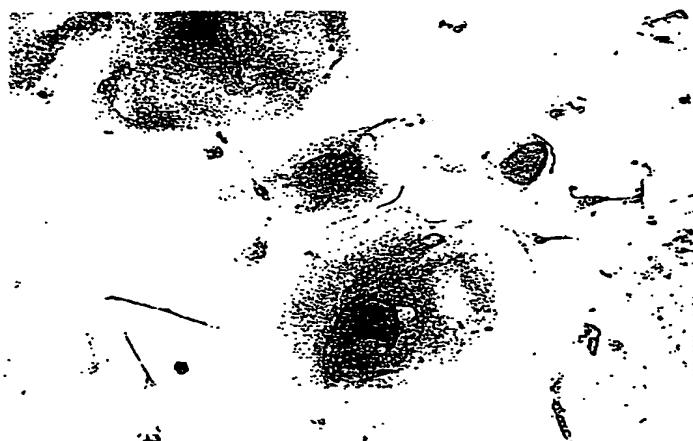


破骨細胞 ($\times 20$)

【図2】



破骨細胞前駆細胞



破骨細胞

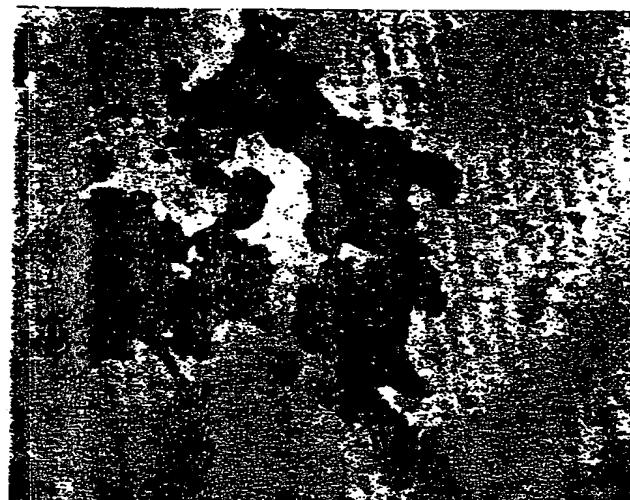
BEST AVAILABLE COPY

特平10-170407

【図3】



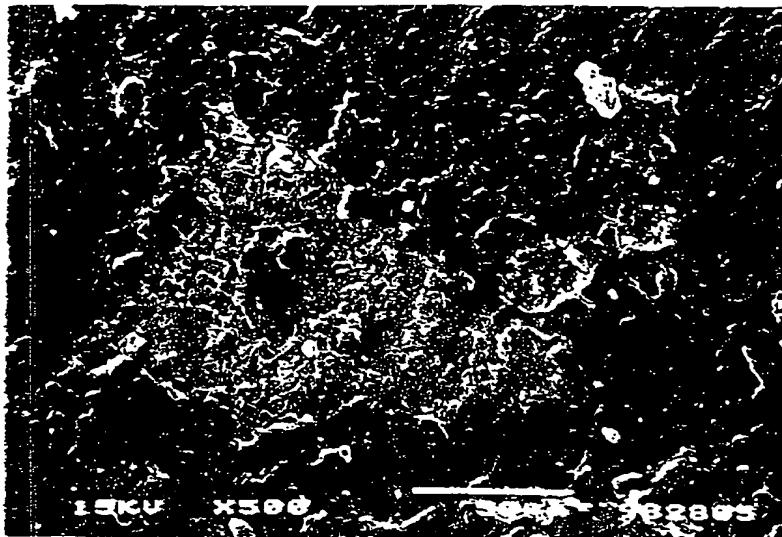
破骨細胞前駆細胞



破骨細胞

特平10-170407

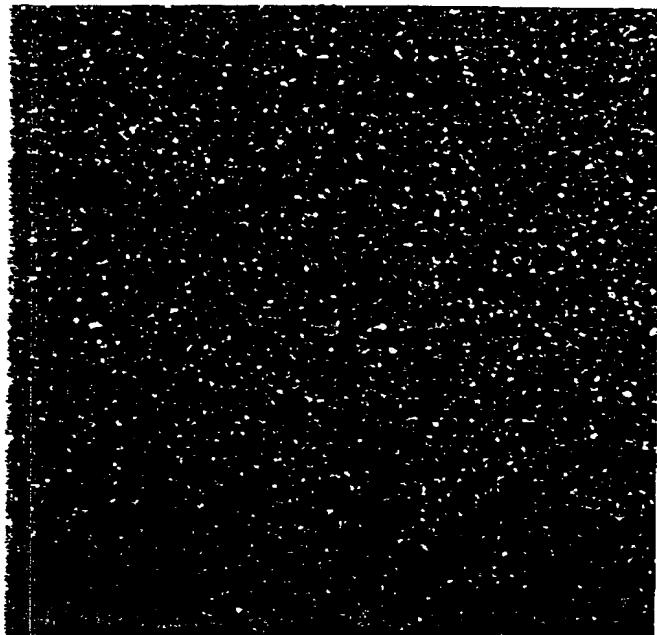
【図4】



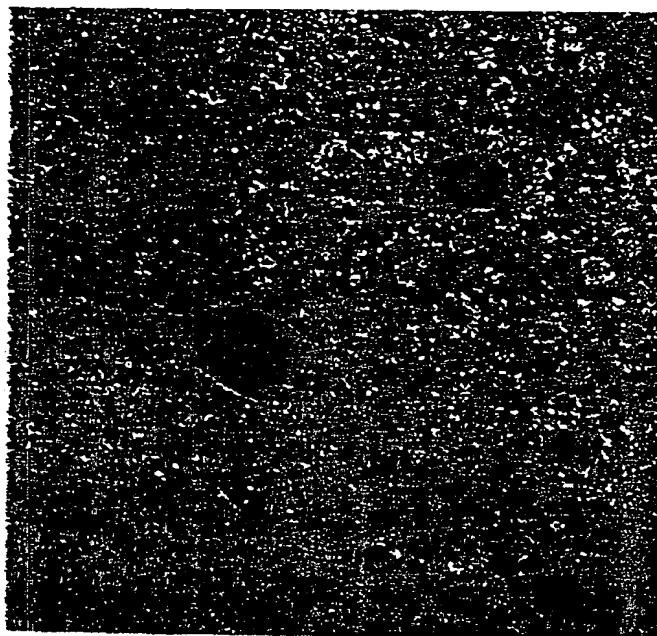
BEST AVAILABLE COPY

特平 10-170407

【図5】



破骨細胞前駆細胞



破骨細胞

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 破骨細胞の分化誘導に関する因子を少なくし、破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法を提供する。

【解決手段】 支持細胞非存在の培養条件で破骨細胞前駆細胞を破骨細胞に分化させる方法により、分化誘導に関与した因子が少ない破骨細胞を得る。

【選択図】 なし

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000001926
【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社

【代理人】
【識別番号】 100108970
【住所又は居所】 大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩野義
【氏名又は名称】 製薬株式会社 特許部
山内 秀晃

出願人履歴情報

識別番号 [000001926]

1. 変更年月日 1990年 8月23日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

氏 名 塩野義製薬株式会社

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)